

龚浪, 孙英硕, 许润达, 等. 理化因素对非洲猪瘟病毒灭活效果的研究 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 348-356.

GONG Lang, SUN Yingshuo, XU Runda, et al. The inactivation effects of physicochemical factors on African swine fever virus [J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 348-356.

理化因素对非洲猪瘟病毒灭活效果的研究

龚浪[✉], 孙英硕, 许润达, 陈熊男, 高琦, 黄钊, 陈孝军, 郑佳琛,
郭彦辰, 吴芮霞, 曾凡亮, 王衡, 张桂红[✉]

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】了解我国非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 的生物学特性及理化抗性, 提高猪场生物安全水平以防控非洲猪瘟。【方法】通过红细胞吸附试验和 qPCR 试验验证不同理化因素 (包括静置、温度、UVC 照射、室内外干燥、阳光暴晒和消毒剂) 对 ASFV 的灭活效果。【结果】UVC 照射 30 min 即可灭活病毒, 照射时间越长, ASFV 核酸降解越严重; 室内干燥 2.5 d、室外干燥 1.5 d、阳光暴晒 30 min 均可灭活 ASFV, 但不能降解 ASFV 核酸; 常见消毒剂对 ASFV 的杀灭效果良好, 各消毒剂按照推荐稀释浓度室温作用 15 或 30 min, 除碘酸混合溶液外均能使 ASFV 完全失活; 温度升高 (4、25 和 37 °C) 会增强消毒剂的消毒作用; 有机物 FBS 的存在会削弱消毒剂的作用, 且随 FBS 体积分数增加 (0、10% 和 30%) 消毒剂的消毒效果会降低。【结论】本文系统研究了常见的理化因素对 ASFV 灭活效果的影响, 有助于全面了解 ASFV 生物学特性, 对非洲猪瘟的防控具有重要指导意义。

关键词: 非洲猪瘟病毒; 理化抗性; 消毒剂; 病毒灭活; 核酸降解

中图分类号: S855

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0348-09

The inactivation effects of physicochemical factors on African swine fever virus

GONG Lang[✉], SUN Yingshuo, XU Runda, CHEN Xiongnan, GAO Qi, HUANG Zhao, CHEN Xiaojun, ZHENG Jiachen,
GUO Yanchen, WU Ruixia, ZENG Fanliang, WANG Heng, ZHANG Guihong[✉]
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】The purpose of this research was to understand the biological characteristics and physicochemical resistance of African swine fever virus (ASFV) in China, so as to improve the biosafety level of pig farms for the prevention and control of African swine fever. 【Method】Hemadsorption test and qPCR test were used to verify the inactivation effects of different physicochemical factors (including static treatment, temperature, UVC irradiation, indoor and outdoor drying, sun exposure and disinfectant) on ASFV. 【Result】UVC irradiation for 30 min could inactivate the virus, the longer the irradiation time, the more serious degradation of ASFV nucleic acid. Indoor drying for 2.5 d, outdoor drying for 1.5 d or sun exposure for 30 min could inactivate ASFV, but these three physical factors had no effect on ASFV nucleic acid degradation. ASFV was susceptible to common disinfectants tested in study, except iodate mixed solution, all disinfectants could completely inactivate ASFV when treated at room temperature at the recommended diluted concentration for 15 or 30 min.

收稿日期: 2022-03-23 网络首发时间: 2023-04-03 09:34:56

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230331.1659.004.html>

作者简介: 龚浪, 副教授, 博士, 主要从事动物传染病研究, E-mail: gonglang@scau.edu.cn; 通信作者: 张桂红, 教授, 博士, 主要从事动物传染病研究, E-mail: guihongzh@scau.edu.cn

基金项目: 广东省重点研发计划 (2019B020211003); 国家自然科学基金 (31941004); 国家重点研发计划 (2021YFD1800104); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-35)

An increase in temperature (4, 25 and 37 °C) enhanced the inactivation effect of disinfectants. The presence of organic compound FBS could weaken the effect of disinfectants, and an increase in the volume fraction of FBS (0, 10% and 30%) could reduce the inactivation effect. 【Conclusion】 This paper systematically studies the effects of common physicochemical factors on the inactivation of ASFV, which is helpful to fully understand the biological characteristics of ASFV, and has important guiding significance for clinical prevention and control of African swine fever.

Key words: African swine fever virus; Physicochemical resistance; Disinfectant; Virus inactivation; Nucleic acid degradation

非洲猪瘟 (African swine fever) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的一种急性、热性、出血性和高度接触性的烈性传染病, 可感染不同品种和各个年龄阶段的猪, 感染致死率高达 100%。世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health) 将其列为 A 类动物疫病, 也是法定报告动物疫病。ASFV 是一种囊膜病毒, 基因组为双链 DNA, 大小为 170~192 kb^[1], 其在全球的蔓延, 特别是在中国的暴发, 严重威胁了全球猪肉生产和食品安全^[2]。ASFV 主要通过直接接触猪只及其分泌物或间接接触垫料、饲料、车辆等传播^[3]。猪群一旦感染 ASFV, 只能通过扑杀和彻底消毒来阻断 ASFV 的传播。目前非洲猪瘟既无有效疫苗用于预防, 也无有效药物用于治疗, 只能通过严格的生物安全手段进行防控。因此, 充分了解 ASFV 的生物学特性, 对于合理制定非洲猪瘟的防控措施极为重要^[4]。

ASFV 对外界环境的抗性研究不仅有助于了解该病毒的生物学特性, 对疾病的防控也意义重大。早在 1921 年, 有研究指出 ASFV 对高温和干燥等物理因素具有极强的抗性^[5]。消毒剂的使用是猪场提高生物安全、防控非洲猪瘟的重要手段^[6]。理想的消毒剂应是高效、作用时间长、无毒性、不受环境因素影响、作用范围广^[7], 但消毒剂受外界环境因素的影响较大, 如有机物、温度等因素都会影响其消毒效果^[8]。无论是物理性消毒还是化学性消毒都能够将病原微生物降低到一定程度, 使消毒的受体不再是传染源^[9]。

ASFV 传入我国后, 在基因组的重要位点发生了一定的插入、缺失和替换, 这可能会导致其生物学特性的改变。因此, 全面了解 ASFV 对各种物理和化学因素的耐受性很有必要, 本研究利用 C 频段紫外线 (UVC) 照射、室内室外干燥、阳光暴晒和各种化学消毒剂处理 ASFV, 通过猪肺泡巨噬细胞 (Porcine alveolar macrophages, PAM) 的红细胞吸附

(Hemadsorption, HAD) 试验和 qPCR 试验, 测定 ASFV 的红细胞吸附特性和基因拷贝数, 系统地评估各种常见物理因素和化学消毒剂对 ASFV 活性杀灭和核酸降解的影响, 为猪场临床防控非洲猪瘟提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 细胞和毒株

PAM 由华南农业大学张桂红教授课题组 (本课题组) 统一分离制备, 保存于液氮中; ASFV 毒株 GZ201801(MT496893.1) 由本课题组分离, 保存于华南农业大学动物生物安全三级实验室。

1.2 主要试剂

DNA 抽提试剂盒为北京索莱宝科技有限公司产品; 磷酸盐缓冲液 (PBS)、RPMI-1640、胎牛血清 (FBS) 和含 0.25% (w) EDTA 的胰酶购自美国 GIBCO 公司; 高保真 DNA 聚合酶、不同大小的 DNA marker 为日本 TaKaRa 公司产品; Probe qPCR Mix 为天根生物有限公司产品; 细胞染料台盼蓝购自 Invitrogen 公司; 细胞冻存液购自集美赛公司; 氯胺酮、咪达唑仑、阿托品和戊巴比妥钠均为上海恒远生物科技有限公司产品; CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 其他常用试剂均购自生工生物工程 (上海) 有限公司。

1.3 猪红细胞的制备

用肝素钠抗凝管收集新鲜的猪外周血, 按照 1:8 的体积比加入适量的 PBS, 轻轻上下颠倒数次后, 2000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重复洗涤 3~4 次, 最后一次弃上清液后, 用与最初取血体积相等的 PBS 重悬红细胞沉淀, 即为制备的红细胞悬液 (红细胞体积分数约为 2%), 最好现用现配, 若 4 °C 保存, 时间不应超过 3 d, 一旦出现溶血, 便不得使用。

1.4 qPCR 的测定

利用引物设计软件设计 ASFV P72 基因的 qPCR 引物, 具体引物信息^[10]见表 1。

表 1 ASFV P72 基因和猪 β -actin 基因的 qPCR 引物与探针
Table 1 Primer and probe for qPCR of ASFV P72 gene and porcine β -actin gene

引物/探针 Primer/probe	序列 Sequence	位置/bp Location
ASFV	F: 5'-CCC AGG RGA TAA AAT GAC TG-3'	893~912
	R: 5'-CAC TRG TTC CCT CCA CCG ATA-3'	940~960
	5'-/56-FAM/ GGC CAG GA /36-TAMSp/-3'	930~937
β -actin	F: 5'-GGA TGC AGA AGG AGA TCA CG-3'	1 022~1 041
	R: 5'-ATC TGC TGG AAG GTC GAC AG-3'	1 132~1 151
	5'-/56-FAM/ GGC CAG GA/36-TAMSp/-3'	1 121~1 128

qPCR 的反应体系与反应物均按照 TIANGEN 的快速定量 PCR 试剂 (探针法) 说明书配置。qPCR 在 LightCycle®96 检测系统上进行, PCR 反应程序: 95 ℃ 预变性 1 min; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火、延伸各 15 s, 共 40 个循环。qPCR 完成后, 通过相应的配备软件分析各个样品的 Ct。

1.5 不同静置条件对 ASFV 的影响

将 ASFV 病毒溶液分别用纯水、生理盐水和猪血液 (动脉血和静脉血) 稀释至病毒含量为 10^4 HAD₅₀/mL (HAD₅₀ 为半数红细胞吸附量), 于不同温度 (4、25、37 ℃) 条件下静置。每天进行样品回收, 通过 HAD 试验判定病毒是否存活, 每个处理 3 次重复。

1.6 UVC 照射对 ASFV 的影响

将含有 ASFV 的含 FBS(ϕ 为 50%) 细胞培养液或者含有 ASFV 的细胞培养液, 用 PBS 将病毒含量稀释为 10^5 HAD₅₀/mL, 封装于直径 33 mm 平皿中, 每个平皿加 500 μ L 培养液, 在 UVC 强度为 110~120 μ W/cm² 条件下进行照射处理, 处理时间分别为 30、60、90、120、150、180、210 min 和 0、3、6、9、15、20、30、40、50、60 min。UVC 处理完成后, 将 50 μ L 样品加入预先铺有 PAM 的 96 孔细胞培养板中, 通过 HAD 试验判定不同 UVC 照射时间对病毒的影响, 同时通过 qPCR 检测 UVC 对 ASFV 核酸的影响。每个处理 3 次重复, 结果用平均值 $\pm$ 标准差表示。

1.7 干燥条件对 ASFV 的影响

将含有 ASFV 的细胞培养液, 用 PBS 稀释至病毒含量为 10^5 HAD₅₀/mL, 封装于直径 33 mm 平皿中, 平皿盖子上钻有 3 个直径 2 mm 的小孔, 每个平皿加 200 μ L, 在生物安全柜中快速通风干燥。然后分别置于室内和模拟的室外环境处理, 记录环境温度。分别在干燥 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0 d 后, 取 50 μ L 样品加入预先铺有 PAM 的 96 孔细胞培养板中, 通过 HAD 试验判定不同干燥程度对病毒的影响。同时, 通过 qPCR 试验检测干燥对 ASFV 核酸的影响, 结果用平均

值 $\pm$ 标准差表示。并且, 测定不同干燥条件对 ASFV 滴度变化的影响。

1.8 阳光暴晒对 ASFV 的影响

将含有 ASFV 的细胞培养液, 用 PBS 稀释至病毒含量为 10^5 HAD₅₀/mL, 封装于 EP 管中, 每管加 50 μ L, 然后挑选有阳光照射的地方进行暴晒处理。记录 UVC 强度、空气温度、阳光直射温度, 分别在处理 0、5、10、15、20、30、35、50 和 60 min 后, 将 50 μ L 样品加入预先铺有 PAM 的 96 孔细胞培养板中, 通过 HAD 试验判定不同暴晒时间对病毒的影响, 通过 qPCR 试验检测阳光暴晒对 ASFV 核酸的影响, 并且测定阳光暴晒对 ASFV 滴度的影响。

1.9 消毒剂对 ASFV 的杀灭效果

分别选取不同类别不同有效成分含量的消毒剂: 甲醛 (醛类, 甲醛体积分数 37%~40%); 柠檬酸 (酸类, 柠檬酸体积分数 $\geq$ 99.5%); 烧碱 (碱类, 氢氧化钠体积分数 $\geq$ 95%); 卫可 (过氧化物类, 过硫酸氢钾中有效氯体积分数 $\geq$ 10%); 84 消毒液 (氯制剂类, 有效氯体积分数 5% 左右); 漂白粉 (氯制剂类, 次氯酸钙中有效氯体积分数 30%~35%); 二氯异氰尿酸钠 (氯制剂, 有效氯体积分数 30%); 百毒杀 (季铵盐类, 癸甲溴铵体积分数 $\geq$ 10%); 戊二醛 (醛类, 戊二醛体积分数 20%); 安灭杀 (戊二醛和季铵盐混合类, 戊二醛、季铵盐体积分数分别为 15%、10%); 复合酚 (酚和醋酸混合类, 酚体积分数 41%~49%、醋酸体积分数 22%~26%); 戊二醛癸甲溴铵溶液 (戊二醛和癸甲溴铵混合类, 戊二醛体积分数 5%、癸甲溴铵体积分数 5%); 复方戊二醛 (戊二醛和苯扎氯铵混合类, 戊二醛体积分数 15%、苯扎氯铵体积分数 10%) 和碘酸混合溶液 (碘和磷酸混合类, 碘体积分数 3%、磷酸体积分数 30%)。按照各消毒剂的使用说明推荐的比例进行稀释。随后, 将各消毒剂与病毒含量为 10^5 HAD₅₀/mL 的 ASFV 病毒液按照体积比 1:1 混合, 室温条件下分别作用 15 和 30 min。最后, 将样品稀释至对细胞安全范围, 再加入预先

铺有 PAM 的 96 孔细胞培养板中, 通过 HAD 试验判定不同消毒剂及其不同作用时间对病毒的影响。

1.10 温度对消毒剂杀灭 ASFV 效果的影响

分别选取不同类别消毒剂: 季铵盐类、复合酚、过硫酸氢钾、戊二醛和碱类, 将各类别消毒剂用 PBS 稀释, 并与等体积 10⁵ HAD₅₀/mL 的病毒溶液在预定温度 (4、25、37 ℃) 处理后混合, 作用 5 和 15 min 后, 将样品稀释至对细胞安全范围, 再加入预先铺有 PAM 的 96 孔细胞培养板中, 通过 HAD 试验判定在不同温度条件下不同消毒剂对病毒杀灭效果的影响。

1.11 有机物 FBS 对消毒剂杀灭 ASFV 效果的影响

分别选取不同类别消毒剂: 季铵盐类、复合酚、过硫酸氢钾、戊二醛和碱类, 将各类别消毒剂用含不同含量 FBS 的 PBS 稀释, 并与等体积 10⁵ HAD₅₀/mL 的病毒溶液混合。混合后, 消毒剂终浓度达到预期稀释浓度, FBS 体积分数分别为 0、10% 和 30%, 作用 15 和 30 min 后, 将样品稀释至对细胞安全范围, 再加入预先铺有 PAM 的 96 孔细胞培养板中, 通过 HAD 试验判定不同含量 FBS 对不同消毒剂杀灭病毒效果的影响。

1.12 HAD₅₀ 结果判定

取各种理化因素与消毒剂处理完成的病毒溶液 50 μL, 加入预先铺有 PAM 的 96 孔细胞培养板中, 每个样品 1 孔, 37 ℃ 孵育 2 h 后, 弃去病毒液, 加入细胞培养液, 于 37 ℃、5%(φ)CO₂ 培养箱培养 4 d 后, 加入新鲜配置 1%(φ) 猪红细胞溶液 40 μL, 于 37 ℃、5%(φ)CO₂ 培养箱继续培养 24 h 后在显微镜下观察是否出现红细胞吸附。若出现红细胞吸附, 则表明有 ASFV 的存在, 标记为“+”; 若无红细胞吸附, 则表明无 ASFV 的存在, 标记为“-”; 结果不确定或 3 次重复结果不一致, 则标记为“±”。

2 结果与分析

2.1 ASFV 滴度的测定

取 ASFV 在 PAM 细胞上增殖培养后的细胞培养上清液, 测定病毒滴度为 10⁶ HAD₅₀/mL。按照试验需求, 将病毒滴度调整为 10⁵ HAD₅₀/mL, 放置于 -80 ℃ 保存。

2.2 不同静置条件对 ASFV 存活的影响

ASFV 在不同条件下静置处理后, 用 HAD 试验检测病毒存活情况, 结果显示: 室温 (25 ℃) 条件下, ASFV 的感染力在猪静脉血中能保持 14 d, 在猪动脉血中能保持 30 d, 在纯水中能保持 22 d, 在生理盐水中能保持 60 d 以上; 将含 ASFV 的纯水和生

理盐水置于不同温度 (4、25、37 ℃) 条件下, 温度越低, ASFV 感染力保持时间越长 (表 2)。

表 2 ASFV 在不同条件下静置的存活天数
Table 2 Survival days of ASFV standing under different conditions

样品 Sample	4 ℃	25 ℃	37 ℃
猪静脉血 Swine venous blood		14	
猪动脉血 Swine arterial blood		30	
纯水 Pure water	36	22	17
生理盐水 Normal saline	>75	>60	40

2.3 ASFV 对 UVC 照射的耐受

在强度为 110~120 μw/cm² 的 UVC 作用下, 30 min 及以上时间的照射即可使含 FBS 细胞培养液或细胞培养液中的 ASFV 完全失活, 失去感染细胞的能力, 表明 ASFV 对 UVC 敏感, 含 FBS 细胞培养液中的 ASFV 和细胞培养液中的 ASFV 对 UVC 敏感性相似 (表 3)。此外, 通过 qPCR 试验分析 UVC 对

表 3 UVC 照射对含 FBS 细胞培养液和细胞培养液中 ASFV 感染力的影响
Table 3 Effect of UVC irradiation on ASFV infection in FBS-containing cell supernatant and cell supernatant

培养液 Supernatant	t/min	红细胞吸附 ¹⁾ Hemadsorption	Ct
含FBS细胞培养液 FBS-containing cell supernatant	0	+	26.65±0.37
	30	-	28.03±0.95
	60	-	29.32±0.72
	90	-	31.34±0.89
	120	-	32.44±1.11
	150	-	32.83±0.82
	180	-	32.77±0.91
细胞培养液 Cell supernatant	210	-	31.61±1.88
	0	+	24.65±0.29
	3	+	22.12±1.59
	6	+	23.58±0.61
	9	+	24.01±0.82
	15	+	24.27±0.41
	20	+	25.02±0.65
	30	-	25.89±0.52
	40	-	27.54±1.28
	50	-	28.15±0.77
	60	-	30.16±0.39

1) “+”: 红细胞吸附, “-”: 无红细胞吸附
1) “+”: Hemadsorption, “-”: No hemadsorption

ASFV 核酸的影响,结果显示:UVC 能够降低 ASFV 对细胞的感染能力,高强度的 UVC 能够破坏 ASFV 遗传物质,UVC 作用时间越长,qPCR 检测得到的 Ct 越高,对 ASFV 核酸的降解越严重(表 3)。

2.4 ASFV 对干燥的耐受

在试验环境条件下,模拟室外环境温度为 28~32 ℃,室内环境温度为 25~26 ℃。在模拟的干燥室外环境,ASFV 在 1.5 d 后失活,而在干燥的室内环境,2.5 d 后失活;其病毒感染力也随处理时间的延长逐渐下降,室外干燥 1.5 d、室内干燥 2.5 d 后,ASFV 完全失活(表 4)。结果表明 ASFV 对干燥敏感,在干燥环境下快速失去感染细胞的能力。

通过 qPCR 试验分析干燥对 ASFV 核酸的影响,结果显示:在短期内,室外和室内干燥环境下,检测出的 Ct 相近,且变化不明显,表明不论是室内还是室外的干燥环境对 ASFV 遗传物质的影响均不明显(表 4)。

表 4 室外和室内干燥环境对 ASFV 感染力的影响
Table 4 Effects of outdoor and indoor drying environment on ASFV infection

环境 Environment	t/d	红细胞吸附 ¹⁾ Hemadsorption	lg(病毒滴度)/ (HAD ₅₀ ·mL ⁻¹) lg(Virus titer)	Ct
室外 Outdoor	0	+	6.67±0.07	24.75±0.24
	0.5	+	3.38±0.33	24.86±0.65
	1.0	+	3.17±0.44	25.33±0.36
	1.5	+	1.59±0.26	25.48±0.71
	2.0	-	0	24.21±0.33
	2.5	-	0	24.18±0.72
	3.0	-	0	24.12±1.21
	4.0	-	0	24.74±1.47
	4.5	-	0	25.01±0.57
	5.0	-	0	25.67±0.78
室内 Indoor	0	+	6.50±0.13	24.58±0.44
	0.5	+	3.67±0.56	24.62±0.58
	1.0	+	1.75±0.13	24.55±1.36
	2.0	+	0	25.60±0.87
	2.5	+	0	25.87±1.72
	3.0	-	0	25.02±0.65
	3.5	-	0	25.92±0.21
	4.0	-	0	27.54±1.28
	4.5	-	0	28.15±0.77
	5.0	-	0	30.16±0.39

1) “+”: 红细胞吸附,“-”: 无红细胞吸附
1) “+”: Hemadsorption,“-”: No hemadsorption

2.5 ASFV 对阳光暴晒的耐受

试验环境条件下,记录到 UVC 强度为 25~30 μw/cm²、空气温度为 32 ℃、阳光直射温度为 38~40 ℃。ASFV 的感染力随处理时间的延长而逐渐降低,30 min 及以上时间的暴晒处理,都能使 ASFV 完全失活,失去感染细胞的能力(表 5)。此外,通过 qPCR 试验分析培养液中 ASFV 核酸,Ct 变化不明显,表明阳光暴晒对液体水环境中 ASFV 遗传物质的影响不明显(表 5)。

表 5 阳光暴晒对细胞培养液中 ASFV 感染力的影响
Table 5 Effects of sun exposure on ASFV infection in cell supernatant

t/min	红细胞吸附 ¹⁾ Hemadsorption	lg(病毒滴度)/ (HAD ₅₀ ·mL ⁻¹) lg(Virus titer)	Ct
0	+	6.63±0.33	24.98±0.56
5	+	6.55±0.38	24.35±1.09
10	+	4.34±0.47	24.39±0.76
15	+	2.71±0.29	25.10±0.35
20	+	2.84±0.82	24.06±1.55
30	-	1.67±0.19	24.53±0.93
35	-	0	24.27±0.95
50	-	0	24.98±0.79
60	-	0	24.87±2.12

1) “+”: 红细胞吸附,“-”: 无红细胞吸附
1) “+”: Hemadsorption,“-”: No hemadsorption

2.6 消毒剂对 ASFV 的杀灭

通过 HAD 试验验证各种类别的代表消毒剂对 ASFV 的杀灭效果,按照推荐的稀释倍数,甲醛、烧碱、84 消毒液、漂白粉、二氯异氰尿酸钠、安灭杀、复合酚、戊二醛癸甲溴铵溶液和复方戊二醛都能使 ASFV 完全失活,柠檬酸稀释 100 倍、卫可≤200 倍、百毒杀≤300 倍、戊二醛≤2 000 倍能使 ASFV 完全失活,失去吸附红细胞的能力(表 6)。当戊二醛稀释倍数为 1:5 000,作用时间必须≥30 min 才能使 ASFV 完全失活。综上,除碘酸混合溶液外,各类别消毒剂都能有效杀灭 ASFV,且消毒效果随消毒剂浓度的提高和消毒时间的延长而增强。

2.7 温度对消毒剂杀灭 ASFV 的影响

季铵盐类消毒剂(二癸基二甲基氯化铵体积分 数≥10%)对 ASFV 的杀灭作用受温度影响不明显(图 1a);复合酚(酚体积分数为 41%~49%、醋酸体 积分数为 22%~26%),过硫酸氢钾(有效氯体积分 数≥10%),戊二醛(戊二醛体积分数为 20%)和碱 类(碱质量分数约 15%)4 种消毒剂对 ASFV 的杀 灭效果均受温度影响(图 1b~1e)。随着温度降低,

表 6 消毒剂对 ASFV 红细胞吸附能力的影响

Table 6 Effects of disinfectants on ASFV hemadsorption capacity

名称 Name	类别 Classification	有效成分 Active ingredient	稀释倍数 Dilution ratio	红细胞吸附 ¹⁾ Hemadsorption	
				15 min	30 min
甲醛 Formaldehyde	醛类 Aldehydes	甲醛 Formaldehyde	1 : 100	—	—
			1 : 200	—	—
			1 : 500	—	—
柠檬酸 Citric acid	酸类 Acids	柠檬酸 Citric acid	1 : 50	—	—
			1 : 100	—	—
烧碱 Caustic soda	碱类 Alkalines	氢氧化钠 Sodium hydroxide	1 : 200	+	+
			1 : 50	—	—
			1 : 100	—	—
卫可 Virkon	氧化剂 Oxidizers	过硫酸氢钾 Potassium hydrogen persulfate	1 : 200	—	—
			1 : 400	—	—
			1 : 800	+	+
84消毒液 84 disinfectant	氯制剂 Chlorine preparations	有效氯 Available chlorine	1 : 100	—	—
			1 : 200	—	—
			1 : 400	—	—
漂白粉 Bleaching powder	氯制剂 Chlorine preparations	次氯酸钙 Calcium hypochlorite	1 : 250	—	—
			1 : 500	—	—
			1 : 1 000	—	—
二氯异氰尿酸钠 Dichlorocyanuric acid	氯制剂 Chlorine preparations	有效氯 Available chlorine	1 : 250	—	—
			1 : 500	—	—
			1 : 1 000	—	—
百毒杀 Povidone iodine solution	季铵盐类 Quaternary ammonium salts	二癸基二甲基溴化铵 Didecyl dimethyl ammonium bromide	1 : 300	—	—
			1 : 600	+	±
			1 : 1 200	+	+
戊二醛 Glutaraldehyde	醛类 Aldehydes	戊二醛 Glutaraldehyde	1 : 1 000	—	—
			1 : 2 000	—	—
			1 : 5 000	+	—
安灭杀 Anabasin	混合制剂 Mixed preparations	戊二醛、季铵盐 Glutaraldehyde, quaternary ammonium salt	1 : 100	—	—
			1 : 200	—	—
			1 : 400	—	—
复合酚 Compound phenol	混合制剂 Mixed preparations	酚、醋酸 Phenol, Ethylic acid	1 : 100	—	—
			1 : 200	—	—
			1 : 400	—	—
戊二醛癸甲溴铵溶液 Glutaral and deciquam solution	混合制剂 Mixed preparations	戊二醛、二癸基二甲基溴化铵 Glutaraldehyde, didecyl dimethyl ammonium bromide	1 : 500	—	—
			1 : 1 000	—	—
			1 : 1 200	—	—
复方戊二醛 Compound glutaraldehyde	混合制剂 Mixed preparations	戊二醛、苯扎氯铵 Glutaraldehyde, benzalkonium chloride	1 : 150	—	—
			1 : 300	—	—
			1 : 600	—	—
碘酸混合溶液 Iodine and acid mixed solution	混合制剂 Mixed preparations	碘、磷酸 Iodine, phosphoric acid	1 : 100	+	+
			1 : 200	+	+
			1 : 400	+	+

1) “+” : 红细胞吸附, “—” : 无红细胞吸附

1) “+”: Hemadsorption, “—”: No hemadsorption

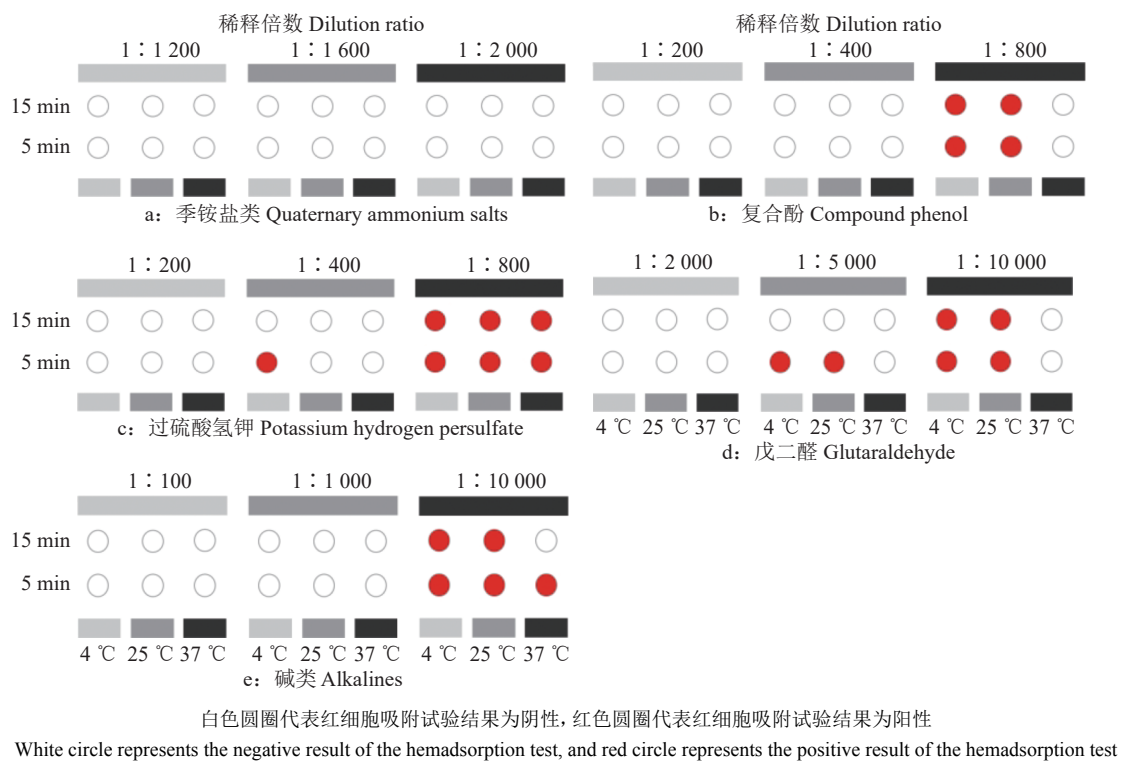


图 1 温度对 5 种消毒剂杀灭 ASFV 的影响

Fig. 1 Influence of temperature on the ASFV inactivation effect of five kinds of disinfectants

消毒剂需要提高作用浓度或者延长作用时间才能起到完全杀灭 ASFV 的效果。综上, 温度严重影响消毒剂对 ASFV 的杀灭效果, 低温不会直接使消毒剂失效, 但在低温条件下, 消毒剂的作用会减弱, 在相对较高的温度条件下, 消毒剂的作用显著增强。

2.8 FBS 含量对消毒剂杀灭 ASFV 的影响

季铵盐类、复合酚、过硫酸氢钾、戊二醛和碱类 5 种消毒剂对 ASFV 的杀灭效果均受 FBS 含量影响; 随着 FBS 含量升高, 消毒剂需要提高作用浓度或者延长作用时间才能完全杀灭 ASFV(图 2)。

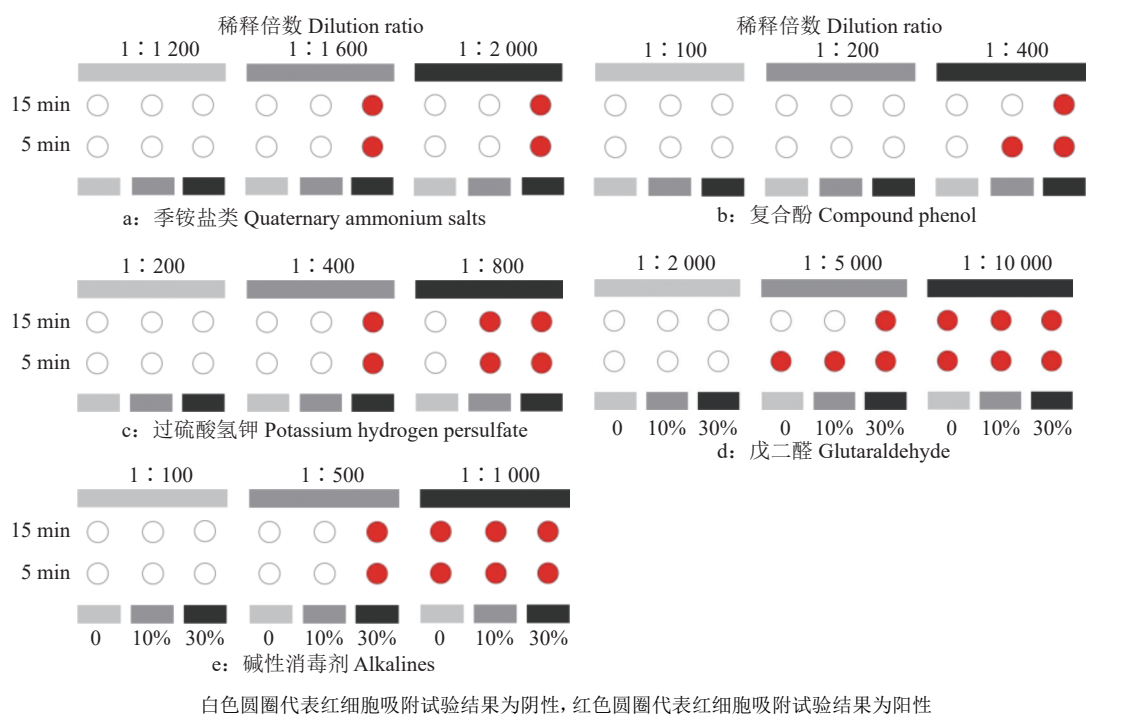


图 2 不同体积分数 FBS 对 5 种消毒剂杀灭 ASFV 的影响

Fig. 2 Influence of FBS with different volume fractions on the ASFV inactivation effect of five kinds of disinfectants

综上, 有机物的存在削弱了消毒剂对 ASFV 的杀灭作用; 有机物含量越高, 消毒剂的作用越弱。

3 结论与讨论

UVC 是一种波长为 200~280 nm 的紫外线。微生物的 DNA、RNA 和核衣壳的紫外吸收峰最高为 254~257 nm, 当微生物吸收紫外线时, 其 DNA 链、核酸和蛋白质的交联断裂。UVC 会相应地破坏核酸的生物活性, 导致微生物死亡。紫外线照射具有很强的消杀作用, 可通过形成吡啶二聚体来灭活多种微生物, 如病毒、细菌、原生动物、真菌、酵母和藻类等^[11]。本研究发现在 110~120 μw/cm² 的 UVC 照射强度下, ASFV 不管是在含 FBS 的细胞培养液中, 还是在细胞培养液中都可被灭活, 丧失吸附猪红细胞的能力, 照射 30 min 及以上, 可使 ASFV 完全灭活。同时, UVC 照射具有很强的降解 ASFV 核酸的能力; qPCR 检测结果显示, 经长时间 110~120 μw/cm² UVC 照射后, 无论是在含 FBS 的细胞培养液还是在细胞培养液中, ASFV DNA 的 Ct 均会升高, 说明核酸浓度降低。前期研究发现 3 600 μw/cm² 紫外线照射强度可在 3 s 内完全灭活 ASFV^[12]; 并且, 在 3 600 μw/cm² 强度的紫外线照射条件下, 细胞培养液中 ASFV 的核酸在 60 s 内即可被破坏。可见, 紫外线强度够大, 能够瞬间灭活 ASFV。UVC 是一种物理消毒方法, 在足够强度的照射下, 水中的微生物可以在短时间内被有效灭活。污水是养殖场生物安全最大的威胁之一, 而灭活水中的微生物是防止非洲猪瘟传播的重要途径。

相对于其他病毒, ASFV 对不同传播介质均有极强的抗性。本研究中 ASFV 在不同条件下静置处理的结果表明, ASFV 在猪血中能存活 14~30 d, 在纯水中能存活 22 d, 在生理盐水中能存活 60 d 以上。如果静置温度降低, ASFV 的存活时间将会更长, 可见温度是影响 ASFV 存活的重要因素, 当温度升高到 70 ℃ 以上时, ASFV 可在 10 s 内被灭活^[13]。结合本研究中 ASFV 对干燥和阳光暴晒的反应: ASFV 在干燥的室外环境, 1.5 d 后失活, 而在干燥的室内环境, 2.5 d 后失活; ASFV 在暴晒 30 min 后完全失活。由此可以得到启发, 在猪场管理中, 应时刻保持猪舍的通风、干燥, 有条件的情况下要尽可能地增加日照时长。这对于非洲猪瘟的防控和猪场生物安全水平的提高都有重要意义。

消毒是阻止猪场传染性疾病发生、传播和蔓延的重要手段之一。本研究通过 HAD 试验比较常用的醛类(甲醛、戊二醛)、酸类(柠檬酸)、碱类(烧

碱)、氧化剂类(卫可)、季铵盐类(百毒杀)、氯制剂类(84 消毒液、漂白粉和二氯异氰尿酸钠)和复合型消毒剂(安灭杀、复合酚、复方戊二醛、戊二醛癸甲溴铵溶液、碘酸混合溶液)对 ASFV 的杀灭效果, 结果显示, 除碘酸混合溶液外, 所有的消毒剂都可有效杀灭 ASFV, 使其丧失吸附红细胞的能力, 与前人的研究结果^[14-15]相符。在推荐浓度和一定时间的作用下, 绝大部分消毒剂可以完全灭活 ASFV; 这对生产中消毒剂种类、稀释浓度和作用时间的选择具有指导意义。针对所要杀灭的微生物的特点, 选择合适消毒剂是消毒工作成败的关键。人员、车辆消毒应选择刺激性小、作用时间较快的消毒剂, 如过硫酸氢钾复合物粉、戊二醛类; 空栏、消毒池(盆)消毒应选择作用持续时间长、消毒灭活范围广的消毒剂, 如二氯异氰尿酸钠粉(消毒威)、复合酚(菌毒涂); 洗手、人员体表消毒应选择刺激性小的消毒剂, 如过硫酸氢钾复合物粉、季铵盐类等。ASFV 对各种外界条件都有很强的抵抗力, 可在粪便和血液中较长时间保持传染性, 在有机物存在的情况下, 病毒可能更稳定, 存活时间更长。消毒剂的使用受外界条件的影响很大, 如作用时间、温度、是否含有机物等, 都会影响消毒效果^[16-17]。本研究结果表明, 有机物的存在会影响消毒剂对 ASFV 的灭活效果, 有机物含量越高, 消毒剂的灭活效果越弱。此外, 消毒剂对 ASFV 的灭活效果随着温度的升高而增加。因此, 为了更科学、高效地使用消毒剂, 我们建议在使用消毒剂之前应先将物体清洗干净, 以减少物体表面的干扰物质。在对猪场表面含有血液、粪便等有机物的区域进行消毒时, 为了完全灭活病毒, 应适当增加消毒剂的浓度, 延长作用时间。

参考文献:

[1] ALONSO C, BORCA M, DIXON L, et al. ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae[J]. *Journal of General Virology*, 2018, 99(5): 613-614.

[2] DIXON L K, STAHL K, JORI F, et al. African swine fever epidemiology and control[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2020, 8: 221-246.

[3] NIEDERWERDER M C, STOIAN A M M, ROWLAND R R R, et al. Infectious dose of African swine fever virus when consumed naturally in liquid or feed[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(5): 891-897.

[4] GALLARDO C, SÁNCHEZ E G, PÉREZ-NÚÑEZ D, et al. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses[J]. *Vaccine*, 2018, 36(19): 2694-2704.

[5] MONTGOMERY R E. On a form of swine fever occur-

- ring in British East Africa (Kenya colony)[J]. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 1921, 34: 159-191.
- [6] JUSZKIEWICZ M, WALCZAK M, MAZUR-PANASIUK N, et al. Effectiveness of chemical compounds used against African swine fever virus in commercial available disinfectants[J]. *Pathogens*, 2020, 9(11): 878. doi: 10.3390/pathogens9110878.
- [7] ZHANG L, LUO Y, WANG W, et al. Efficient inactivation of African swine fever virus by ozonized water[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247: 108796. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108796.
- [8] OLESEN A S, BELSHAM G J, RASMUSSEN T B, et al. Potential routes for indirect transmission of African swine fever virus into domestic pig herds[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(4): 1472-1484.
- [9] JUSZKIEWICZ M, WALCZAK M, WOŹNIAKOWSKI G. Characteristics of selected active substances used in disinfectants and their virucidal activity against ASFV[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2019, 63(1): 17-25.
- [10] FERNANDEZ-PINERO J, GALLARDO C, ELIZALDE M, et al. Molecular diagnosis of African swine fever by a new real-time PCR using universal probe library[J]. *Transboundary of Emerging Diseases*, 2013, 60(1): 48-58.
- [11] KIM D K, KANGA D H. UVC LED irradiation effectively inactivates aerosolized viruses, bacteria, and fungi in a chamber-type air disinfection system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(17): e00944-18. doi: 10.1128/AEM.00944-18.
- [12] XU R, GONG L, WANG H, et al. Disinfection effect of short-wave ultraviolet radiation (UV-C) on ASFV in water[J]. *Journal of Infection*, 2020, 80(6): 686-687.
- [13] GONG L, XU R, WANG Z, et al. African swine fever recovery in China[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2020, 6(4): 890-893.
- [14] KRUG P W, DAVIS T, O'BRIEN C, et al. Disinfection of transboundary animal disease viruses on surfaces used in pork packing plants[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 219: 219-225.
- [15] KRUG P W, LARSON C R, ESLAMI A C, et al. Disinfection of foot-and-mouth disease and African swine fever viruses with citric acid and sodium hypochlorite on birch wood carriers[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156(1/2): 96-101.
- [16] HERNÁEZ B, GUERRA M, SALAS M L, et al. African swine fever virus undergoes outer envelope disruption, capsid disassembly and inner envelope fusion before core release from multivesicular endosomes[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(4): e1005595. doi: 10.1371/journal.ppat.1005595.
- [17] KALMAR I D, CAY A B, TIGNON M. Sensitivity of African swine fever virus (ASFV) to heat, alkalinity and peroxide treatment in presence or absence of porcine plasma[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 219: 144-149.

【责任编辑 李庆玲】